DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.036

分光光度法测定小鼠组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力

Determination of glutathione peroxidase activity by spectrophotometric method in rat tissue

汤建林 周世文 徐传福 (第三军医大学附属新桥医院临床药理基地) 重庆,630037

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是哺乳类动物体内广泛存在的一种重要的催化过氧化物分解的酶类。目前国内外测定GSH-Px活力的方法主要分为直接法和间接法两类[1~4]。本研究在夏奕明等[1]有关GSH-Px测定方法学的基础上,对直接法作了改进,并应用于小鼠肝、肾组织中GSH-Px活力测定。所建方法灵敏度高、重复性好、使用仪器简单。

1 材料和方法

1.1 试剂(除注明外,均采用分析纯试剂)

1.1.1 叠氮化钠-磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 叠氮化钠16.3 mg,磷酸氢二钠7.16 g,磷酸二氢钠3.12 g,EDTA 7.4 mg,双蒸水溶解并稀释至近100 ml,用4.8 mol/l NaOH调至pH 7.0,最后定容于100 ml量瓶中,冰箱保存。

1.1.2 1.0 mmol/L GSH溶液(临用前配制) 称取GSH 3.07 mg,用叠氮化钠-磷酸盐缓冲液溶解并定容于10 ml量瓶中。

1.1.3 1.0 mmol/L DTNB显色液 DTNA 20 mg,柠檬酸三钠500 mg,双蒸水溶解并定容于50 ml量瓶中,棕色瓶避光保存于4℃冰箱中。

1.1.4 其它试剂 1.25 mmol/L H_2O_2,0.16 mol/L三氯醋酸(TCA),0.32 mol/L磷酸氢二钠,4.8 mol/L NaOH。

1.2 仪器和实验动物

日本岛津UV-2201紫外分光光度计。昆明种小白鼠体重20 g左右,雌雄兼用。

1.3 GSH标准曲线的制作

取0,0.04,0.08,0.12,0.16,0.20 ml 1.0 mmol/L GSH,加TCA 1.60 ml,用双蒸水稀释成浓度为0,20,40,60,80,100 μmol/L的GSH标准液各2 ml,再在各管内依次加入Na^2HPO_4 0.2 ml,NaOH 0.10 ml,DTNB 0.5 ml,以试剂空白管校零,于408 nm波长处比色。标准曲线的回归方程为[ABS]=0.0054[C]+0.0307,相关系数r=0.9985

1.4 组织上清液中GSH-Px活力测定

1.4.1 样本制备 小鼠处死后,立即取出肝、肾放入冷生理盐水中洗去浮血,剔除脂肪和结缔组织,滤约吸干后称取0.3 g,按1:10加入冷生理盐水,冰浴匀浆,匀浆液经3000 r/min离心10 min,得组织上清液,冰箱低温保存。测定时,取此上清液稀释5倍后用于酶活力测定。若当天无法全部测定,则-20℃速冻保存后3 d内测完。

1.4.2 测定步骤及计算 取小试管分别标明测定、试剂空白、非酶反应、样品空白管。测定管中加样品上清液0.4 ml,GSH 0.4 ml;试剂空白管中加双蒸水0.8 ml;非酶反应管中加GSH 0.4 ml,双蒸水0.4 ml;样品空白管中加样品上清液(已加热使酶失活)0.4 ml,双蒸水0.4 ml混匀后37℃水浴保温5 min,加H_2O_2应用液(已预温),混匀后立即计时,37℃保温3 min,加TCA 4.0 ml,混匀,冰浴,3000 r/min离心3 min,取上清液2.0 ml加Na_2HPO_4 2.5 ml,NaOH 0.1 ml,DTNB 0.5 ml,显色10 min后,试剂空白调零,408 nm处测定。GSH-Px活力计算如下:

$$\text{组织 GSH-Px 活力单位数} = \frac{([GSH]_{非酶管} - [GSH]_{样品管} + [GSH]_{样品空白管}) \times 5}{3\ \text{min} \times \text{样品蛋白质的数 mg}}$$

2 结果和讨论

2.1 波长选择

本法在夏奕明方法基础上作了改进。他所选择的波长为422 nm,我们对由测定样品和不同比例的DTNB组成的混合样品进行光谱扫描,发现游离的5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子在408 nm处有最大吸收。若以双蒸水作参比,则过量的DTNB在此处有干扰,若改用试剂空白作比,则DTNB的干扰可消除。故本方法选用试剂空白作参比,408 nm处为测定波长。

2.2 最佳pH值和最佳显色时间的选择

5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子的显色与整个反应体系中[H]及反应时间密切相关。为此,我们考察了不同pH和反应时间下,408 nm处吸光度值变化情况,试验结果显示,pH在6.20~6.80间,显色10 min后25 min内A值稳定不变,吸光度值较大,因此我们选择pH 6.50,显色10 min后进行测定。

2.3 GSH测定的回收率与精密度

我们分别试验了不同浓度下GSH测定的回收率,平均值为肝95.8%,肾91.0%。批内批间变异(RSD)为肝6.49%和7.58%,肾4.25%和4.71%。

关键词 谷胱甘肽;过氧化酶类/分析;分光光度法
中图法分类号 O554.6

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

1 夏奕明,朱莲珍.血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法.卫生研究,1987;16(4):29
2 黄履成,唐琼华.谷胱甘肽过氧化物酶的检测及意义.临床检验杂志,1993;11(1):45
3 荣征星,刘慧中,鲍景奇等.小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶活力的微量测定法.生物化学与生物物理进展,1994;21(4):362
4 Schofield T D, Chen X J. Analysis of free reduced and free oxidized glutathione in wheat flour. J Cereal Sci, 1995;21(2):127

(收稿:1995-12-28;修回:1996-09-10)
(编辑 王 红、沈锡庚)

中毒患儿的诊断和治疗

Diagnosis and treatment of intoxication in children

陈晓熹 (第三军医大学附属西南医院儿科)重庆,630038

1 临床资料

我院于1975年~1996年收治中毒患者87例。男47例,女40例,年龄17 d至14岁;治疗药物59例,农药11例,灭鼠药5例,灭害灵、汽油、桐油、硫酸铜、烧碱、皂角水、蓖麻子、蟾蜍各1例,食物4例;自服32例,其中因想不通8例,闹着玩1例,未认识其危害23例;他人给药44例,其中超过治疗剂量18例,误服6例,毒性反应16例,皮肤接触性5例。治愈82例,好转3例,未治1例,死亡1例。

2 诊断

中毒的诊断主要依据毒物接触史和临床表现。

对突然出现的腹痛、青紫或肤色潮红、多汗、狂躁、昏迷、惊厥、恶心、呕吐和发热症状而原因不明,或家中、集体儿童机构中有数人同时发病等考虑有急性中毒的可能。本组患儿有一家人同时发生食物中毒;有3例学龄前儿童同时服过量宝塔糖中毒;有1例幼儿食混有鼠药的油炸麻药后出现频繁呕吐、腹痛、反复抽搐最后昏迷,但家长否认看见食用,2天后患儿清醒,经追问,证实了鼠药中毒。

应仔细了解患儿的生活环境和有无接触毒物的可能,检查患儿衣袋及活动环境中有无残留毒物。本组患儿有在敌敌畏灭蚊环境中睡觉而致皮肤和吸入性中毒;有因家中有精神病患者而无意识吞服抗精神病药致中毒;有因自制灭鼠药(含氟乙酰胺)患儿拿药玩耍(家长否认其吞服)而致中毒。这些资料对中毒的诊断提供了重要线索。

体格检查对诊断有一定参考意义。注意一般情况:如神志、呼吸、脉搏、体温、血压,以判断中毒轻重;注意口腔粘膜、颜面皮肤有无糜烂、呼吸气味有无异常、有无呼吸困难、紫绀、肺部罗音和心律失常,以判断中毒药物、途径、部位。

3 治疗

对中毒原因尚未明确者,在进行诊断的同时给予抢救措施,对诊断正确者立即行有效急救处理。

尽快清除毒物,把进入人体尚未吸收或已被吸收的毒物从不同途径清除,以防止中毒症状的进一步加重。

催吐:适应于年龄较大和合作、神志清楚、而食入毒物时间在4 h~6 h以内,胃内尚存有毒物者。强酸强碱中毒因灼伤粘膜故不宜催吐,以防胃及食道发生破裂、穿孔。神志不清及婴儿因不合作而易致窒息或吸入性肺炎,亦忌用此法。临床多用温清水或1:2000高锰酸钾溶液,每次100 ml~200 ml令患儿迅速服下,然后以压舌板刺激咽后壁,引起反射性呕吐,反复多次,直至呕吐物不含毒物残渣为止。现已不用或少用饱和盐水催吐,以免导致高钠血症[1]。

洗胃:强酸强碱中毒切忌洗胃,因可致胃穿孔,油剂中毒或昏迷者洗胃可能引起吸入性肺炎,应特别小心。

洗胃尽早进行,一般于服入毒物4 h~6 h内洗胃有效。但下列情况则不应受时间限制而应定时反复洗胃:毒物量进入较多;毒物在胃内排空时间延长者(如有机磷);毒物吸收后可再从胃分泌者(如鸦片类、有机磷);带肠衣的药片[2]。

洗胃方法包括插胃管洗胃和切开洗胃。我们多采用胃管注射器抽吸法洗胃。在紧急情况下选择清水作为洗胃液最适宜,因为清水取用方便,可避免配制洗胃液而延误抢救时机,并可防止洗胃液选择不当而致不良后果[2]。

对皮肤接触中毒者,立即脱去已污染的衣物,用温清水反复冲洗皮肤、毛法等。对强酸或强碱污染皮肤时,先用干布轻轻抹干然后冲洗。强酸用淡肥皂水冲洗,强碱用食用淡醋冲洗。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net